

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสร้างรีคอมบีแนนท์แอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟวีต่อฮีโมโกลบินบาร์ทส์

ผู้เขียน นายสมพล แพรพันธุ์

ปริญญา วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร. วิโรจน์ ตันติเวชอกกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. ลักษณา มกรแก้วเกษร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	อ. ดร. สรศักดิ์ อินทรสุต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ศึกษารูปแบบพันธุกรรมและความชุกที่เป็นปัจจุบันของโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย ในหญิงตั้งครรภ์ท้องแรกที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 638 ราย ด้วยวิธีมาตรฐานแก็ปพีซีอาร์ และพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จากการตรวจรูปแบบพันธุกรรมของโรคอัลฟาธาลัสซีเมีย พบว่าเป็นพาหะและโรคอัลฟาธาลัสซีเมียจำนวน 229 ราย คิดเป็น 35.89% สามารถจำแนกได้เป็น 1) โรคฮีโมโกลบินเอชจำนวน 18 ราย (2.82%) 2) พาหะชนิดอัลฟาศูนย์จำนวน 78 ราย (12.23%) 3) พาหะอัลฟาบวชนิด 3.7 กิโลเบสจำนวน 99 ราย (15.52%) 4) พาหะโฮโมไซกัสอัลฟาบวชนิด 3.7 กิโลเบสจำนวน 5 ราย (0.78%) 5) พาหะอัลฟาบวชนิด 4.2 กิโลเบสจำนวน 2 ราย (0.31%) 6) พาหะอัลฟาบวชนิดฮีโมโกลบินซีเอสจำนวน 27 ราย (4.23%) การศึกษานี้พบความชุกของรูปแบบพันธุกรรมในโรคอัลฟาธาลัสซีเมียที่ยังคงมีค่าสูงและวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจหา มีข้อจำกัด จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อนและสามารถใช้ตรวจหาโรคอัลฟาธาลัสซีเมียได้ เมื่อนำรูปแบบพันธุกรรมชนิดต่างๆ ของอัลฟาธาลัสซีเมียมาวิเคราะห์เพื่อให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมแก่คู่สมรสที่มีปัญหาของโรคพันธุกรรมชนิดนี้ ก็จะช่วยให้การป้องกันและการควบคุมโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น การศึกษาก่อนหน้านี้ใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับฮีโมโกลบินบาร์ทส์ในเลือด ซึ่งปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ทส์ในเลือดนี้ใช้เป็นดัชนีบอกชนิดของอัลฟาธาลัสซีเมียได้ แต่มีข้อบกพร่องของการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างและหลังจากเซลล์ไฮบริโดมา

กล่าวคือเมื่อเลี้ยงเซลล์ไฮบริดโคม่าเป็นเวลานาน เซลล์อาจจะสูญเสียความสามารถในการสร้างและ
หลังโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ เทคนิครีคอมบิแนนท์ที่อื่นนี้อาจจะเป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ไข
ข้อบกพร่องของปัญหาดังกล่าวได้ จึงได้ทำการศึกษาวิจัยโดยใช้เทคนิคนี้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์
แอนติบอดีชนิดเอสซีเอฟจากเซลล์ไฮบริดโคม่าที่สร้างและหลังโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ
อีโมโกลบินบาร์ทส์ เริ่มต้นโดยการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างสายวีเอชและวีแอลของแอนติบอดี
และพิสูจน์ด้วยการหาลำดับเบส นำยีนวีเอชและวีแอลมาต่อเข้าด้วยกันโดยใช้ตัวเชื่อมโยงขนาดสั้น
แล้วสอดแทรกเข้าไปในพลาสมิด หลังจากนั้นพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียอี.โคไลและเลี้ยงแบคทีเรีย
ให้ผลิตโปรตีนได้รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเชื่อมต่อ พบว่าเซลล์แบคทีเรีย
สร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในรูปที่ไม่ละลายน้ำ และมีน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดัลตัน หลังจากทำ
บริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดจำเพาะและทำให้การพับม้วนโครงสร้างของรีคอม
บิแนนท์แอนติบอดีกลับไปอยู่ในสภาพธรรมชาติแล้ว ได้ผลผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีประมาณ 1
มิลลิกรัมต่อการเลี้ยงแบคทีเรียปริมาณ 1 ลิตร เมื่อทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี
ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน 2 วิธีคือเวสเทิร์นบลอตและอีไลซ่า พบว่ารีคอมบิแนนท์แอนติบอดีนี้จับได้อย่าง
จำเพาะกับอีโมโกลบินบาร์ทส์ แต่ไม่จับกับอีโมโกลบินชนิดอื่นๆ ได้แก่อีโมโกลบินเอ อีโมโกลบิน
เอฟ อีโมโกลบินเอส อีโมโกลบินอี อีโมโกลบินเอสสอง และอีโมโกลบินเอช ทดสอบค่าความไวต่อการ
จับอีโมโกลบินบาร์ทส์ด้วยวิธีคอตบลอตอีไลซ่า มีค่า 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อคำนวณค่าคงที่
การจับอีโมโกลบินบาร์ทส์จากวิธีอีไลซ่า มีค่า $8.31 \pm 1.28 \times 10^5$ โมลาร์⁻¹ งานวิจัยนี้พบว่า
รีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะต่ออีโมโกลบินบาร์ทส์สูง อาจจะใช้ทดแทนโมโน
โคลนอลแอนติบอดีได้ และรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่สร้างขึ้นใหม่นี้ก็น่าจะนำมาพัฒนาวิธีทาง
ภูมิคุ้มกันที่มีความไวและความจำเพาะต่ออีโมโกลบินบาร์ทส์เพื่อใช้ตรวจหาอัลฟาธาลัสซีเมียใน
ประชากรได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Generation of Recombinant ScFv Antibody to Hemoglobin Bart's	
Author	Mr. Somphon Phraephan	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul	Co-advisor
	Dr. Sorasak Intorasoot	Co-advisor

ABSTRACT

Common genotypes and update data of the prevalence of α -thalassemias were determined in 638 northern Thai primigravidarum. Standard methods for gene analysis, gap-polymerase chain reaction (PCR) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), were used for the identification of α -thalassemia genotypes. The overall prevalence of α -thalassemias was 35.89% (229/638 samples) and could be classified into: 1) deletional HbH disease ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) for 18 samples (2.82%); 2) heterozygous α^0 -thalassemia $--^{SEA}$ type ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) for 78 (12.23%); 3) heterozygous α^+ -thalassemia $-\alpha^{3.7}$ type ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) for 99 (15.52%); 4) homozygous α^+ -thalassemia $-\alpha^{3.7}$ type ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) for 5 (0.78%); 5) heterozygous α^+ -thalassemia $-\alpha^{4.2}$ type ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) for 2 (0.31%); and 6) heterozygous HbCS ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) for 27 (4.23%). Due to the still high prevalence of α -thalassemias and the limitation of the standard methods, a simple and practical method was essentially developed for the determination of α -thalassemia genotypes. Analysis of α -thalassemia genotypes coupled with genetic counseling for the high risk couples should enable the effective prevention and control of this genetic disorder. Previous studies reported the immunoassay using monoclonal antibody for the detection of Hb Bart's (γ_4) in blood circulation for the presence of different genotypes of α -thalassemias. However, there were disadvantages of hybridoma secreting monoclonal antibody that might be

gradually lost the synthesis and secretion of monoclonal antibody during long-term cultivation. Recombinant DNA technology seemed to be a good choice to solve the mentioned problems. This technology was used to generate a novel recombinant scFv antibody derived from mouse hybridoma producing monoclonal antibody highly specific to Hb Bart's. The genes encoding variable regions of the heavy (V_H) and light (V_L) chains were cloned and identified by DNA sequencing. The V_H and V_L genes were connected via a short linker to form the full length V_H -linker- V_L construct and ligated into pET28a(+). The His tag-scFv fusion protein was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The recombinant scFv antibody was mostly expressed as inclusion bodies with the predicted molecular weight of 28 kDa. After purification and refolding, the yield of scFv antibody was estimated to be about 1 mg per liter of bacterial culture. This scFv antibody was very specific by reacting with Hb Bart's (γ_4) but not cross-react with HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbF ($\alpha_2\gamma_2$), HbS ($\alpha_2\beta_2^S$), HbE ($\alpha_2\beta_2^E$), HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) and HbH (β_4), as determined by Western blot and indirect ELISA. The detection sensitivity of this scFv antibody was 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of Hb Bart's, as determined by dot blot ELISA. The affinity constant of scFv antibody to Hb Bart's was $8.31 \pm 1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, as evaluated by indirect ELISA. The produced scFv antibody with high specificity to Hb Bart's might be used as an alternative to the parent monoclonal antibody. This novel recombinant scFv antibody might be useful in development of a sensitive and specific immunoassay for diagnosis of α -thalassemias in population.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved